

06.2.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月31日

REC'D 27 FEB 2004

出願番号
Application Number: 特願2003-094881

WIPO

PCT

[ST. 10/C]: [JP2003-094881]

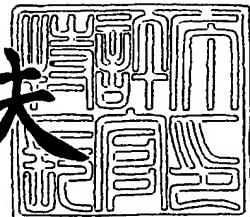
出願人
Applicant(s): 昭和电工株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 SDP4539
【提出日】 平成15年 3月31日
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
【国際特許分類】 C12P 1/00
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター内
【氏名】 蒲池 元昭
【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市北区新川2条13丁目4-3
【氏名】 惠良田 知樹
【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市西区八軒3条西5丁目2-26-46
【氏名】 田島 健次
【特許出願人】
【識別番号】 000002004
【住所又は居所】 東京都港区芝大門一丁目13番9号
【氏名又は名称】 昭和電工株式会社
【代表者】 大橋 光夫
【代理人】
【識別番号】 100081086
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町二丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 大家 邦久
【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100117732

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 信彦

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100121050

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 林 篤史

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0213106

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素反応による高分子化合物の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法。

【請求項 2】 高分子化合物がポリエステルである請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】 ポリエステルがポリヒドロキシアルカノエートである請求項 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】 ポリヒドロキシアルカノエートがポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)である請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】 ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)がポリ(3-ヒドロキシブチレート)である請求項 4 に記載の製造方法。

【請求項 6】 チオエステル交換反応がアシルチオエステルからアシルコエンザイム A を生成する反応である請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 7】 アシルチオエステルがチオフェニルエステルである請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】 チオフェニルエステルがヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】 ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルである請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】 高分子重合酵素反応がアシルコエンザイム A からの高分子重合反応である請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 12】 高分子重合酵素がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼである請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】 ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼがラルストニア

(Ralstonia) 属由来である請求項12に記載の製造方法。

【請求項14】 ラルストニア (Ralstonia) 属がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) である請求項13に記載の製造方法。

【請求項15】 ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699である請求項14に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は酵素反応による高分子化合物の製造方法に関する。さらに詳しく言えば、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させてアシルコエンザイム（アシルC o A）を反応系内で再生させてチオエステルから高分子化合物を一貫して合成することの出来る効率的な生分解性の高分子化合物、特にポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年環境問題への意識の高まりから、従来主流を占めてきた合成高分子から環境に優しい生分解性高分子への関心が高まっている。

【0003】

その一つであるポリヒドロキシアルカノエート（以下、P H Aと略記することがある。）は、一般には微生物の発酵生産により製造され、生分解性が高いことから注目を集めているポリエステルであり、90種以上の種類のものが知られている（FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219-228）。その中でもポリ（3-ヒドロキシブチレート）（以下、P H Bと略記することがある。）、ポリ（3-ヒドロキシバレート）（以下、P H Vと略記することがある。）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-c o -3-ヒドロキシバレート）（以下、P H B-c o -P H Vと略記することがある。）は、その製造のしやすさ、及びその特性が良好であったことから研究開発が進んだ（特開昭57-150393号公報、特開昭59-220192号公報、特開昭63-226291号公報、特開昭63-269989号公報）。しかし微生物

の発酵生産では微生物体内にP H Aを蓄積するためにその生産性は低く、また微生物を粉碎してP H Aを抽出し、精製するためにコストもかかるなど問題点も多かった。

【0004】

その後、発酵生産のメカニズムの解析が進んだことから微生物体内へのP H Aの蓄積濃度が飛躍的に向上し、また、微生物体内へのP H Aの蓄積状態の解析が進んだことから微生物からの抽出、精製コストも下がる結果となり、P H Aの実用化が始まった。

【0005】

また、P H Aを生産する微生物も多種に渡ることが次第に明らかになってきたことから、P H B、P H V、P H B-c o-P H V以外のP H Aへの研究開発も急速に進み、物性を改良するためコポリマーの研究開発もされている（特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報、特開平1-222788号公報、特開平5-93049号公報）。

【0006】

しかし、微生物の発酵生産によるP H Aの製造方法では複雑な生物代謝経路を経るために必ずしも所望のP H Aを作り出せるわけではなく、またP H Aのバリエーションも限定される。また発酵生産の制御方法によっては所望のホモポリマーとならずにコポリマーになることもあり、また逆にコポリマーア生産においても必ずしも所望の重合比の均質なコポリマーを生産できる訳ではない（FEMS Microbiol. Rev., 1992, 103, 207-214）。さらに精製工程においても多種の化合物を含む微生物菌体より所望のP H Aを取り出すために、その純度の向上にも工業的生産においては限界がある。このように微生物発酵によるP H Aの製造は様々な問題を抱えている。

【0007】

一方、近年急速に進んだ遺伝子組換え技術により、P H Aを重合する酵素であるポリヒドロキシアルカノエートシンターゼ（P H A S）の遺伝子が単離され、その発現を増強することによりP H Aの生産の向上も図られるようになった（特開平7-265065号公報、特開平10-108682号公報、特表2001-516574号公報）。

【0008】

さらに遺伝子組換え技術を使うことでP H A S の大量分離精製もできるようになり、微生物発酵を用いないP H B のインビトロ (in vitro) 重合方法が開発され、均質で高純度なP H B が生産できるようになった (Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92, 6279-6283, Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35, Eur. J. Biochem., 1994, 226, 71-80, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, 49, 258-266, Macromolecules, 2000, 33, 229-231)。

【0009】

その後、P H B 以外のP H A も同様のインビトロ (in vitro) 重合方法で合成できることが示され、微生物発酵法では達成できなかったP H A のバリエーションの制限が無くなり、P H A のバリエーションが格段に広がることが示唆された (Biomacromolecules, 2000, 1, 433-439, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56, 131-136, Macromolecules, 2001, 34, 6889-6894)。この方法ではホモポリマー以外にコポリマーをも合成することが可能である。

【0010】

しかし、インビトロ (in vitro) 重合方法では反応出発物質に極めて高価である補酵素であるコエンザイムA (C o A) のチオエステルであるアシルC o A を使用しなければならない。またこの合成方法は極めて複雑にならざるを得ない。C o A のチオエステルの製法としては、幾つかの化学合成法が知られている (J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2520, J. Biol. Chem., 1985, 260, 13181)。しかし、これらの化学合成法は概して反応選択性が低く、副反応のために収率が低い。また酵素反応を用いたC o A のチオエステルの合成方法もある (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 40, 699-709) が、これらの酵素反応法ではその触媒である酵素を必要量得ることが非常に困難である。

【0011】

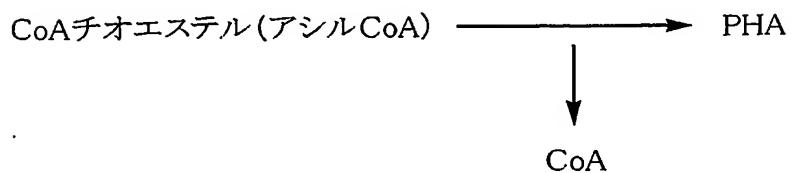
このようにC o A チオエステルを出発物質にした場合には高分子化合物の工業的生産は極めて困難である。そのためC o A チオエステルの使用量を極めて少量に抑えることや、工業的に容易に合成可能な他の化合物を出発物質として用いる高分子化合物の製造方法の開発が望まれている。

【0012】

一方、インビトロ (in vitro) 重合方法では、酵素の基質としてCoAチオエステルを用い、酵素が反応してPHAが重合されると共に、反応系内には遊離したCoAが放出される。

【0013】

【化1】



【0014】

従って、インビトロ (in vitro) 重合方法ではこのCoAは遊離状態のまま反応系内に留まり蓄積されるのみであり、高分子重合反応の収率は反応系内に投入したCoAチオエステルの当量を超えることはない。このためPHAの生産性は極めて低く、インビトロ (in vitro) 重合方法で作製したPHAのコストは非常に高価にならざるを得ない。更に重合が進むにつれて反応系内のCoA濃度が高まることで、酵素反応への阻害効果も懸念される。

【0015】

なお、この遊離して反応系内に高濃度で存在するCoAの有効利用方法としてリサイクリングする試みもなされている(FEMS Microbiology Letters, 1998, 168, 319-324 (非特許文献1))。これは重合酵素反応液中に酢酸とアセチルCoAシンセターゼとATPを共存させることで重合反応後に遊離してくるCoAをアセチルCoAに変換し、さらにプロピオニルCoAトランスフェラーゼと3-ヒドロキシブチレートも共存させることで重合酵素の基質となる3-ヒドロキシブチレートCoAを得るものである。しかしこの方法では精製が困難な酵素を3種類も使用し、さらに極めて高価であるATPも必須であることから工業的な生産方法に適用することは極めて難しい。

【0016】

このようにインビトロ重合方法では、その反応基質に補酵素のチオエステルを使わなければならず、補酵素は非常に高価であることから、これを反応基質に用いたまま P H A を工業的に生産するのでは P H A の製造コストを下げる事が極めて困難であると言わざるを得ない。また補酵素をリサイクリングするにも取得が困難な酵素が多種必要であり、かつ、A T P のような高価な化合物が必要である。さらに P H A の生物、特に微生物を用いた製造方法では、P H A のバリエーションは限定され、更に生物体内での代謝により共重合体が重合される可能性が非常に高く、所望の P H A のみを製造するのは難しいと言える。これらのことから P H A のバリエーションが多く、かつ、その生産において簡易に合成できる化合物を出発物質に用いて、P H A の製造コストが下がるような製造方法の開発が望まれていた。

【0017】

【非特許文献1】

FEMS Microbiology Letters, 1998 年, 168巻, 319-324頁

【0018】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、酵素反応で有用な生分解性の高分子化合物を製造する際に、触媒量の補酵素 (C o A) で効率的に製造できる方法を提供することにある。

【0019】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは前記従来技術の問題を解決し、さらに高効率な P H A の製造方法を開発すべく、有機化合物から P H A に関連する種々の化合物について新たに合成経路を見出すべく鋭意検討を行った結果、インビトロ重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替することが出来、さらに重合反応で必須である補酵素についてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能であり、補酵素の濃度を抑え、その消費量を劇的に減少させることが出来ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0020】

すなわち、本発明は以下の高分子化合物の製造方法に関する。

1. チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法。
2. 高分子化合物がポリエステルである前項1の製造方法。
3. ポリエステルがポリヒドロキシアルカノエートである前項2の製造方法。
4. ポリヒドロキシアルカノエートがポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)である前項3の製造方法。
5. ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)がポリ(3-ヒドロキシプロピレート)である前項4の製造方法。
6. チオエステル交換反応がアシルチオエステルからアシルコエンザイムAを生成する反応である前項1から5の製造方法。
7. アシルチオエステルがチオフェニルエステルである前項6の製造方法。
8. チオフェニルエステルがヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである前項7の製造方法。
9. ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである前項8の製造方法。
10. 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロキシプロピレートチオフェニルエステルである前項9の製造方法。
11. 高分子重合酵素反応がアシルコエンザイムAからの高分子重合反応である前項1から10の製造方法。
12. 高分子重合酵素がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼである前項11の製造方法。
13. ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼがラルストニア (Ralstonia) 属由来である前項12の製造方法。
14. ラルストニア (Ralstonia) 属がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) である前項13の製造方法。
15. ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699である前項14の製造方法。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明は、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法に関するものである。

【0022】

本発明において合成される高分子化合物としては、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから合成される高分子化合物であれば制限はないが、例としては、これまで主に微生物の発酵生産により製造されることが報告されているポリヒドロキシアルカノエート（P H A）を挙げることが出来る。その種類は90種以上が知られている（FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219）。更に具体的には、側鎖にC2以上のアルキル鎖を持つもの、その中にはC6以上、更にはC10以上の長鎖アルキル基を有するもの、側鎖に分岐したアルキル基を持つもの、側鎖にフェニル環を持つもの、その中にはフェニル環に修飾基を有するもの、側鎖にフェノキシ環を有するもの、その中にはフェノキシ環に修飾基を有するもの、側鎖に二重結合あるいは三重結合を有するもの、その中には良好な重合性を示すもの、側鎖にハロゲン元素を有するもの、側鎖にシクロ環を有するもの、側鎖にエポキシ環を有するものなどがある。これらのP H Aはホモポリマーであることもあれば、2種類以上のユニットからなるコポリマーも含まれる。

【0023】

具体的には、アルキル基については Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 92-101など、フェニル環については Macromol. Chem., 1990, 191, 1957-1965、Macromolecules, 1991, 24, 5256-5260、Macromolecules, 1996, 29, 1762-1766など、フェノキシ環については Macromolecules, 1996, 29, 3432-3435、Macromol. Chem. Phys., 1994, 195, 1665-1672など、二重結合については Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54, 2924-2932、Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 85-91、J. Polym. Sci., Part A, 1995, 33, 1367-1374、Macromolecules, 1994, 27, 1675-1679、Macromolecules, 1998, 31, 1480-1486など、三重結合については Macromolecules, 1998, 31, 4760-4763など、ハロゲン元素については Mac-

romolecules, 1990, 23, 3705-3707、J. Chem. Soc. Polym. Commun., 1990, 31, 404-406、Macromolecules, 1992, 25, 1852-1857、Macromolecules, 1996, 29, 4572-4581などエポキシ環については Macromolecules, 1999, 32, 7389-7395などに示されたP H Aも含まれ、炭素数も多様である。

【0024】

高分子化合物の具体例としては、主に生物、特に微生物の発酵生産により製造されることがよく知られているポリ（3-ヒドロキシアルカノエート）やポリ（4-ヒドロキシアルカノエート）を挙げることが出来る。更に、具体的には特にポリ（3-ヒドロキシブチレート）を挙げることができる。

【0025】

本発明に利用できるの高分子重合酵素反応は制限はないが、例としてはアシルコエンザイムAから高分子化合物を生成する反応を挙げることが出来る。特にアシルコエンザイムAとしてはヒドロキシアルカノエートコエンザイムAを用いることが可能であり、その場合は高分子化合物としてP H Aが生成する。

【0026】

本発明で使用する高分子重合酵素としては、本発明のチオエステル交換反応で生成する物質を基質として高分子化合物を合成する高分子重合酵素であればよい。例としては、ヒドロキシアルカノエートC o Aを基質とし、P H Aとする酵素であるポリヒドロキシアルカノエートシンターゼ（P H A S）を挙げることが出来る。高分子重合酵素の取得方法は生物細胞から抽出精製する方法、あるいは生物培養物から抽出精製する方法など多種多様の方法が使われるが、例としてはP H A Sは微生物細胞から抽出精製することが出来る。しかし通常の抽出精製方法では取得出来る酵素量が極めて少量に限られることから、近年は遺伝子組換え技術を利用してP H A Sの遺伝子を単離し（J. Biol. Chem., 1989, 264, 15298-15303、J. Bacteriol., 1988, 170, 4431-4436、J. Bacteriol., 1988, 170, 583-5847）、高発現させることで高分子重合酵素を大量に分離精製できる（J. Biochemistry, 1994, 33, 9311-9320、Protein Expression Purif., 1996, 7, 203-211）。また本発明の高分子重合反応で使用される酵素は、そのまま用いる場合のほかに、固定化酵素などの手法で修飾した酵素を用いることもできる。

【0027】

本発明で用いる高分子重合酵素の由来に生物種としては特に制限はないが、例としてはP H Aの生産がよく知られているラルストニア (*Ralstonia*) 属、シユードモナス (*Pseudomonas*) 属、クロマチウム (*Chromatium*) 属、エクトチオロドスピラ (*Ectothiorhodospira*) 属をはじめ多くの微生物を挙げることが出来る。またこれらの生物由来の高分子重合酵素遺伝子を供与体として有する遺伝子組換え体から高分子重合酵素を取得することも可能である。例としてはラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) ATCC17699のP H A S の遺伝子を単離し、その組換え体エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) を作製して培養し、その培養産物から所望のP H A S を抽出精製して、高分子重合反応の触媒として用いることが可能である。

【0028】

本発明の反応条件としては特に制限がないが、例としては酵素反応が促進される条件として、温度としては0℃から60℃、好ましくは10℃から50℃、さらに好ましくは20℃から40℃で行うことが望ましい。簡便には室温下で反応を行うことも可能である。pHは3から12、好ましくは5から10、さらに好ましくは7から9の間で行うことが望ましい。

【0029】

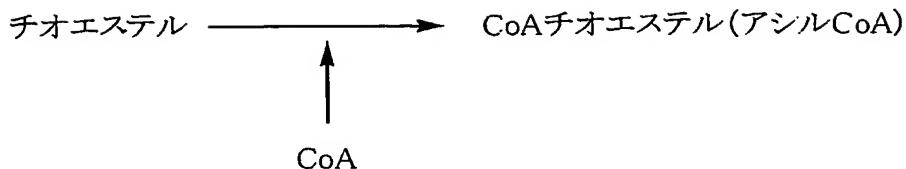
本発明のチオエステル交換反応は、安価な製造しやすいチオエステルから高分子重合酵素の基質となるチオエステルを生成する交換反応であればよいが、例えば、チオエステルとC o AからアシルC o Aを生成する反応を挙げができる。

本発明では、出発物質として工業的に効率的に製造できる化合物であるチオエステルを使用する。チオエステルの製法は例えば、J. Am. Chem. Soc., 1973, 22, 5829に記載されている。

このチオエステルはアルカリ条件でC o A塩と共に存在することで容易にC o AのチオエステルであるアシルC o Aへと変換するチオエステル交換反応が可能である (Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35)。

【0030】

【化2】

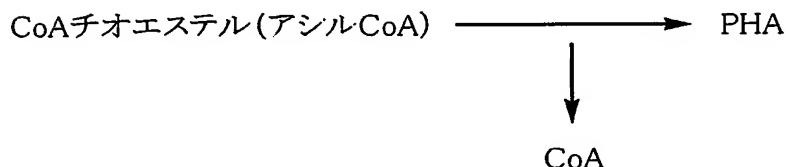


【0031】

一方、インビトロ重合方法では酵素の基質としてCoAチオエステルを用い、酵素が反応してPHAが重合されると共に、反応系内には遊離したCoAが放出される。

【0032】

【化3】



【0033】

従って、従来のインビトロ重合方法ではこのCoAは反応系内に留まり利用されていなかった。またこのために高分子重合反応の収率は反応系内に投入したCoAチオエステルの当量を超えることはない。そのためにPHAの生産性は低く、インビトロ重合方法で作製したPHAのコストは非常に高価にならざるを得ない。更に重合が進むにつれて反応系内のCoA濃度が高まることで酵素反応への阻害効果をもたらすことがあり、その濃度を抑えることはPHAの生産性を高めるのに非常に有効である。

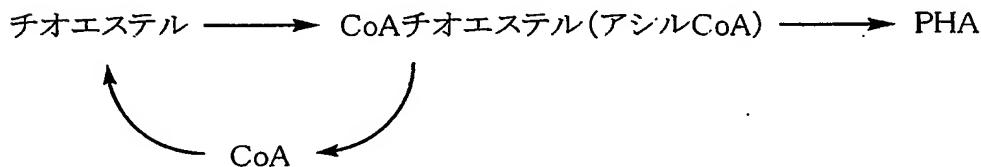
【0034】

本発明は、この上記2つの反応、つまりチオエステル交換反応と高分子重合反応の2つの反応を組み合わせて、これらを1つの反応系内で共存させて実施することにより高分子化合物を製造するものである。この時の共存する状態とは、チオエステル交換反応と高分子重合反応が同一の水溶液、有機溶媒、あるいはその

混合溶液中に存在すること、あるいは同一反応容器内において一種の溶液、あるいは複数の溶液が混合状態あるいは分離状態で存在している状況である。分離状態は、層状の場合、油滴状に存在、あるいは目視的に懸濁した状態などが含まれる。いずれにおいても、チオエステル交換反応と高分子重合反応に必要な状態が一体化して確保されていればよい。そしてその出発物質としては工業的に効率的に製造可能なチオエステルを用いて、これを反応系内でCoAのチオエステル化して重合反応の基質とし高分子化合物を製造する。そして重合反応後には反応系内に遊離されてこれまで再び利用されることのなかったCoAを、反応系内に投入したチオエステルと反応させて、再びCoAのチオエステルを合成せしめ、これを重合反応の基質として再び用いるものである。

【0035】

【化4】



【0036】

これにより反応系内に投入したCoAの当量以上の高分子化合物を生成物として得ることができるようになる。特にこのCoAがチオエステル化と遊離を繰り返すことの反応回転数が多くなればなるほど、高分子化合物の工業的なコストを飛躍的に低価格化させることが可能となる。

【0037】

このように本発明は、高効率にPHAを製造する方法であり、反応出発物質は容易に合成可能なチオエステルを用い、さらにチオエステル交換反応と高分子重合反応が共存した溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法に関わるものである。

【0038】

【実施例】

以下に参考例、実施例及び比較例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本

発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0039】

参考例1 (1) : 3-オキソブチレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で3.9 g のメルドラム酸を18 ml の脱水ジクロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18 ml の脱水ジクロロメタンに溶解した4.3 g のピリジンと2.2 g のアセチルクロライドの溶液を窒素気流下でゆっくりと添加した。攪拌は0℃で1時間の後、室温で2時間行った。混合液を分液漏斗に移し、3% 塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバボレーションして、ゆっくりと固化する濃オレンジ色でオイル状の3.6 g の粗アシル化メルドラム酸を得た。この粗アシル化メルドラム酸を80 ml の脱水エタノール中で還流した。この時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバボレーションで取り除き、赤色オイル状の1.3 g の粗3-オキソブチレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー(20 cm × Φ1 cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル=2:1)で精製し、少し黄色でオイル状の0.60 g の精製3-オキソブチレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して46%であった。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 4.20(q, J=7.1Hz, 2H), 3.47(s, 2H), 2.27(s, 3H), 1.28(t, J=7.1Hz, 3H);

¹³C NMR (in CDCl₃) δ 201.06, 167.44, 61.52, 50.29, 30.32, 14.29

【0040】

参考例1 (2) : 3-ヒドロキシブチレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で75.6 mg の水素化ホウ素ナトリウムを2 ml の脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ520 mg の3-オキソブチレートエチルエステルを2 ml の脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で2時間行い、その後4 ml の水を添加した。混合溶液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで2回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバボレーションして、薄い黄色のオイル状の282 mg の3-ヒドロキシブチレートを得た。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 4.17 (q, J=7.1Hz, 2H), 4.17 (m, 1H), 2.46 (m, 2H), 1.28 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.23 (d, J=6.3Hz, 3H);

¹³C NMR (in CDCl₃) δ 172.93, 64.28, 60.68, 42.91, 22.49, 14.18

【0041】

参考例1 (3) : 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

氷上で乾燥したフラスコ中で 6 m l の脱水ジクロロメタンを搅拌し、そこへ 2 m l の 2 M トリメチルアルミニウムを窒素气流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて 2 mmol のチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で 30 分間搅拌し、続けて 6 m l の脱水ジクロロメタンに溶解した 3-ヒドロキシブチレートを添加した。反応は TLC でモニターした。この混合液に 20 m l のジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで 20 m l の 3 % 塩酸溶液を添加した。混合液を分液漏斗へ移し、3 % 塩酸溶液で 2 回、饱和食塩水で 2 回洗净し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減压下でエバポレーションして濃黄色のオイル状の 532 mg の粗 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル 60 のカラムクロマトグラフィー (20 cm × Φ 1 cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、透明なオイル状の 125 mg の 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。收率は未精製品に対して 24 % であった。その化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 7.38 (s, 5H), 4.33 (m, 1H), 2.83 (m, 2H), 1.25 (d, 3H);

¹³C NMR (in CDCl₃) δ 198.24, 134.90, 130.07, 129.69, 127.61, 65.23, 52.02, 22.85

【0042】

参考例1 (4) : 3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステルの合成

小さなガラス瓶に 39.5 mg のコエンザイム A ナトリウム塩を 0.5 m l の 100 mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH 8.0) に搅拌して溶かした溶液に、9.8 mg の 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを 0.1 m l のアセトニトリルに溶かした溶液を添加した。搅拌は室温で 3 時間続け、次に 0.13 m l の 1 M リン酸を添加した。混合液を 0.5 m l のジエチルエーテルで 3 回洗净し、減压下でエバポレーションして 30 mM の 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステル溶液

を得た。

【0043】

参考例2 (1) : (R) - 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

2.53 g の t-ブチルジメチルシリルクロライドを無水ジメチルホルムアミドに溶かして攪拌したところへ、3.4 g のイミダゾールを添加し、氷上、窒素気流下で15分攪拌した。更に無水ジメチルホルムアミドに溶解した0.5 g の (R) - 3-ヒドロキシブチレートを添加して室温で一晩攪拌した。反応液に60mlの飽和食塩水を加え、ジエチルエーテル：石油エーテル=1：3溶液での抽出を5回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバボレーションした。これをメタノール：テトラヒドロフラン=2：1溶液に溶解し、1.5 g の炭酸カリウムを含む10mlの水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。反応液は飽和食塩水で希釈し、更に1M硫酸でpHを3.0に調整し、ジエチルエーテル：石油エーテル=1：3溶液での抽出を5回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバボレーション後、真空乾燥して3-(t-ブチルジメチルシリル)ブチレートを得た。氷上で、870mgの3-(t-ブチルジメチルシリル)ブチレートと452mgのチオフェノールを6mlのジクロロメタンに溶解し、これに2mlのジクロロメタンに溶解した846mgのジシクロヘキシリカルボジイミドを添加し攪拌後、室温で10時間攪拌した。20mlのジエチルエーテルを加えてろ過後、溶媒をエバボレーションで取り除き、フラッシュクロマトグラフィー（溶離液は5%酢酸エチルを含むヘキサン）で330mgの3-(t-ブチルジメチルシリル)ブチレートチオフェニルエステルを得た。これを2mlアセトニトリルに溶解し、更に6mlの5%フッ化水素を含むアセトニトリル溶液を添加し、ジエチルエーテルで抽出後、飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバボレーションして81mgの(R) - 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。

【0044】

参考例2 (2) : (R) - 3-ヒドロキシブチレートC₆Aチオエステルの合成

3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステルの合成と同様にして、3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液を得た。

【0045】

参考例3（1）：3-オキソバレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で3.9gのメルドラム酸を18m1の脱水ジクロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18m1の脱水ジクロロメタンに溶解した4.3gのピリジンと2.5gのプロピオニルクロライドの溶液を窒素気流下でゆっくりと添加した。攪拌は0℃で1時間の後、室温で2時間行った。混合液を分液漏斗に移し、3%塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして、ゆっくりと固化する濃オレンジ色でオイル状の3.4gの粗アシル化メルドラム酸を得た。この粗アシル化メルドラム酸を80m1の脱水エタノール中で還流した。この時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバポレーションで取り除き、赤色オイル状の1.7gの粗3-オキソバレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー(20cm×Φ1cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル=2:1)で精製し、少し黄色でオイル状の0.50gの精製3-オキソバレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して29%であった。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 4.19(q, J=7.1Hz, 2H), 3.40(s, 2H), 2.58(q, J=7.2Hz, 2H), 1.28(t, J=7.2Hz, 3H), 1.08(t, J=7.2Hz, 3H);

¹³C NMR (in CDCl₃) δ 203.48, 180.07, 61.33, 49.03, 36.32, 14.13, 7.56

【0046】

参考例3（2）：3-ヒドロキシバレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で75.6mgの水素化ホウ素ナトリウムを1m1の脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ288mgの3-オキソバレートエチルエステルを1m1の脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で2時間行い、その後2m1の水を添加した。混合溶液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで2回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバポレーションして、薄い黄色のオイル状の212mgの3-ヒドロキシバレ

ートを得た。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 4.17 (q, J=7.1Hz, 2H), 3.94 (m, 1H), 2.45 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.27 (t, J=7.1Hz, 3H), 0.96 (t, J=7.3Hz, 3H);
¹³C NMR (in CDCl₃) δ 173.30, 69.64, 60.91, 41.46, 29.77, 14.40, 10.07

【0047】

参考例3 (3) : 3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルの合成

氷上で乾燥したフラスコ中で3m1の脱水ジクロロメタンを搅拌し、そこへ1m1の2Mトリメチルアルミニウムを窒素气流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて1mmolのチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で30分間搅拌し、続けて3m1の脱水ジクロロメタンに溶解した3-ヒドロキシバレレートを添加した。反応はTLCでモニターした。この混合液に10m1のジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで10m1の3%塩酸溶液を添加した。混合液を分液漏斗へ移し、3%塩酸溶液で2回、饱和食塩水で2回洗净し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下でエバボレーションして濃黄色のオイル状の258mgの粗3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー (20cm×Φ1cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル=2:1) で精製し、透明なオイル状の44mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。収率は未精製品に対して17%であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 7.39 (s, 5H), 4.04 (m, 1H), 2.82 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 0.98 (t, J=7.1Hz, 3H);
¹³C NMR (in CDCl₃) δ 198.30, 134.67, 129.83, 129.46, 127.31, 70.04, 50.03, 29.67, 9.96

【0048】

参考例3 (4) : 3-ヒドロキシバレレートCoAチオエステルの合成

小さなガラス瓶に79mgのコエンザイムAナトリウム塩を2m1の100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) に搅拌して溶かした溶液に、42mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを1m1のアセトニトリルに溶かした溶液を添加した。搅拌は室温で3時間続け、次に0.53m1の1Mリン酸を添

加した。混合液を2m1のジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下でエバボレーションして33 mMの3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液を得た。

【0049】

参考例4：酵素の作製と精製

ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699のゲノムDNAから制限酵素EcoRIとSmaI断片（約5 kbp）を切り出し、pUC18にクローニングしてPHA合成酵素遺伝子（PHAS）を含むプラスミドpTI305を取得した。次にpTI305のNotI・SstI断片（1.6 kbp）と、pTI305をテンプレートとして下記2種のプライマーでPCRにより増幅したDNAのBamHI・NotI断片（140 bp）と、ベクターpQE30（キアゲン社製）のBamHIとSmaI断片の3種類を混合してライゲーションし、プラスミドpQERECを調整した。これを大腸菌BL21（pREP4）に導入して、酵素調製用の大腸菌BL21（pQEREC）を作製した。この大腸菌を1000m1のLB培地中、30℃で16時間培養し、菌体内に酵素を蓄積させ、超音波処理によって菌体を破壊した後、菌体内の可溶性タンパク質を回収した。このタンパク質をNi-NTAアガロースゲルカラムに通し、（His）-PhaC（N末にヒスチジンが6個付加されている）を特異的にカラムに吸着させた。洗浄後、イミダゾールを用いて（His）-PhaCを溶出し、透析後に精製酵素として10mgを得た。酵素の分子量はSDS-PAGEで65kDaであった。

【0050】

PCRの条件

センスプライマー：AAGGATCCATGGCGACCGGCAAAGGC
GCGG（配列番号1）、

アンチセンスプライマー：TGCAGCGGACCGGTGGCCTCGGCC
TGCCC（配列番号2）、

サイクル：（94℃45秒、58℃30秒、72℃60秒）×30サイクル。

【0051】

実施例1：ポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく搅拌した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5mlの1mMCoAナトリウム溶液と、0.5mlの20mM3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液（100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解）を少しづつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4mgのポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）を得た。分子量（ポリスチレン換算のGPC）はMw=970000であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 5.26(m, H), 2.53(m, 2H), 1.25(s, 3H);

¹³C NMR (in CDCl₃) δ 169.53, 67.99, 41.16, 20.15

【0052】

比較例1：ポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく搅拌した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5mlの1mMCoAナトリウム溶液を少しづつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。

【0053】

実施例2：(R)-3-ヒドロキシブチレートの重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく搅拌した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5mlの1mM3-ヒドロキシブチレートCoA溶液と、0.5mlの20

mM 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液（100 mM リン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解）を少しづつ添加し、さらに30°Cで24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3mgのポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）を得た。

【0054】

比較例2：ポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）の重合

5mlの100 mM リン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30°Cに保ち、5mlの1 mM 3-ヒドロキシブチレートCoAを少しづつ添加し、さらに30°Cで24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.2mgのポリ（(R)-3-ヒドロキシブチレート）を得た。

【0055】

比較例3：

5mlの100 mM リン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30°Cに保ち、ここに0.5mlの20 mM 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液（100 mM リン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解）を少しづつ添加し、さらに30°Cで24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。

【0056】

実施例3：ポリ（3-ヒドロキシバレート）の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、ここに5mlの1mM(R, S)-3-ヒドロキシバレートCoAと、0.5mlの20mM3-ヒドロキシバレートチオフェニルエステル溶液(100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解)を少しづつ添加し、さらに室温で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3mgのポリ((R)-3-ヒドロキシバレート)を得た。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

¹H NMR (in CDCl₃) δ 5.12(m, H), 2.56(m, 2H), 1.53(m, 2H), 0.81(t, 3H);
¹³C NMR (in CDCl₃) δ 169.71, 72.26, 39.17, 27.23, 9.76

【0057】

比較例4：ポリ(3-ヒドロキシバレート)の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として5mlの1mM(R, S)-3-ヒドロキシバレートCoAを少しづつ添加し、さらに室温で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.1mgのポリ((R)-3-ヒドロキシバレート)を得た。

【0058】

実施例4：(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)、1mMCoAナトリウム塩溶液に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。その上に10mM(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを5m

1のヘキサン溶液を重層した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、1.5mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。分子量(ポリスチレン換算のGPC)はMw=107000であった。また、添加したCoAのチオエステル化と遊離の反応回転数は3.4回である。

【0059】

比較例5：(R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)、1mM(R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち搅拌した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。

【0060】

比較例6 (R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち搅拌した。その上に10mM(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを5mlのヘキサン溶液を重層した。搅拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。沈殿物は観察されなかった。

【0061】

【発明の効果】

本発明は、P H A の製造方法において、インビトロ (in vitro) 重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替し、さらに重合反応で必須である補酵素についてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能たらしめ、補酵素の消費量を劇的に減少されることを出来るようによることで、工業的な生産方法への利用を可能とする新規な P H A 製造方法を提供する。この発明により、様々な P H A が安価に効率よく製造できるようになり、その使用範囲も飛躍的に広がるものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Method for Producing Polymer by Enzymatic Reaction

<130> SDP-4539

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer

<400> 1

aaggatccat ggcgaccggc aaaggcgccg

30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer

<400> 2

tgcagcggac cggtggcctc ggcctgcc

29

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵素反応で有用な生分解性の高分子化合物を製造する際に、触媒量の補酵素（C o A）で効率的に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させてアシルコエンザイム（アシルC o A）を反応系内で再生せてチオエステルから高分子化合物を一貫して合成することの出来る効率的な生分解性の高分子化合物、特にポリエステルがポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【選択図】 なし

認定・付力口小青幸良

特許出願の番号	特願2003-094881
受付番号	50300531050
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月 4日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002004

【住所又は居所】 東京都港区芝大門1丁目13番9号

【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081086

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口
第2ビル7階 大家特許事務所

【氏名又は名称】 大家 邦久

【代理人】

【識別番号】 100117732

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口
第二ビル7階 大家特許事務所

【氏名又は名称】 小澤 信彦

【代理人】

【識別番号】 100121050

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口
第2ビル7階 大家特許事務所

【氏名又は名称】 林 篤史

次頁無

特願 2003-094881

出願人履歴情報

識別番号

[000002004]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区芝大門1丁目13番9号

氏 名

昭和電工株式会社